

神経回路におけるカルシウム動態の光学イメージング計測

著者	小山内 実
雑誌名	東北大学医学部保健学科紀要
巻	19
号	1
ページ	1-12
発行年	2010-01-31
URL	http://hdl.handle.net/10097/42222

神経回路におけるカルシウム動態の光学イメージング計測

小山内 実^{1,2}

¹東北大学大学院医学系研究科 医用画像工学分野

²JST, CREST

Optical Imaging of the Calcium Dynamics in Neuronal Circuits

Makoto OSANAI^{1,2}

¹*Radiological Imaging and Informatics, Tohoku University Graduate School of Medicine*

²*JST, CREST*

Key words: brain, neuron, striatum, ensemble recording, signal transduction

Brain consists of tremendous number of neurons. Neurons are connected to each other by tremendous number of synapses, and they form the neuronal circuits. In order to understand functions of the neuronal circuits, we should know the spatiotemporal behavior of the neurons in the large scale network. In this regard, imaging of the neuronal activity using a fluorescent dye is one of the most promising techniques. Among various imaging techniques, the calcium imaging has many advantages, e.g., having a good spatial resolution, production of large signals, ease of loading the calcium indicators into cells using bulk-loading method with acetoxymethyl esters of the calcium indicators, and so on. In addition, intracellular calcium concentration is known to increase not only by the cell excitation, but also by various intercellular signals. In addition, calcium is an important messenger in signal transduction. Thus, to reveal the dynamics of the intracellular calcium concentration leads to elucidate the various physiological functions of the brain. In this review, I will describe significance of the calcium imaging techniques in neuronal circuits, and introduce our recent studies concerning long-lasting spontaneous calcium transients at the striatum of the basal ganglia.

1. はじめに

脳は素晴らしい情報処理装置であることは言うまでもない。図1に示すように、脳は、無数のニューロンから構成され、それらは無数のシナプスで結合している¹⁾。この脳の情報処理機構を知るためには、神経回路を構成する複数のニューロン同士がどのようにコミュニケーションし、動作しているのかを知る必要がある。旧来この目的のために、細胞内記録法^{2,3)}、細胞外記録法⁴⁾、パッチ

クランプ法⁵⁾などの電気生理学的な手法により、単一あるいは少数のニューロン活動を計測する手法が取られてきた。一般的にこれらの方法では、あるニューロンに刺激を与えた時に別のあるニューロンから応答が取れたとすると、それらのニューロン間には結合がある、と結論づけていた。ところが実際の脳では、無数のニューロンが無数のシナプス結合を形成しており(図1)、例えば図2のような単純な神経回路を考えても、その信号伝達経路は複数存在するため、信号がどの経路を通

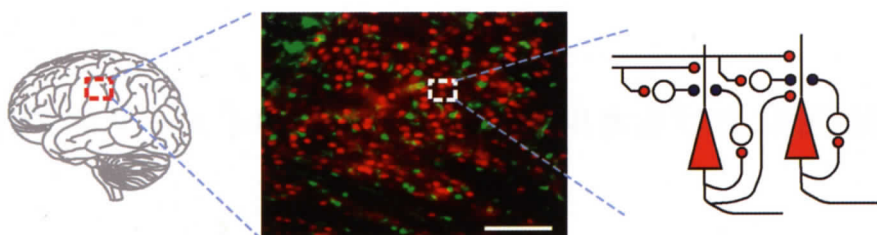


図1. 無数に存在するニューロンとシナプス

脳(左)の一部を切り出してみても、無数のニューロンが存在し(中)、そのニューロン同士が多数のシナプス結合で結合している様子(右)を模式的に表した。(左)脳の模式図。(中)マウス脳組織切片をニューロンマーカーに対する抗体(抗 NeuN 抗体)とグリアマーカーに対する抗体(抗 S100 抗体)を用いて、免疫二重染色した際の蛍光写真。抗 NeuN 抗体に対する二次抗体の蛍光を赤、抗 S100 抗体に対する二次抗体の蛍光を緑で表示している。スケールバー、100 μm 。(右)局所神経回路の模式図。赤い三角の細胞が興奮性ニューロン、白い丸で示した細胞が抑制性ニューロンを示している。小さな赤丸、青丸は、それぞれ興奮性、抑制性のシナプスを示している。このように、細胞同士は複雑にシナプス結合し、神経回路を構成している。

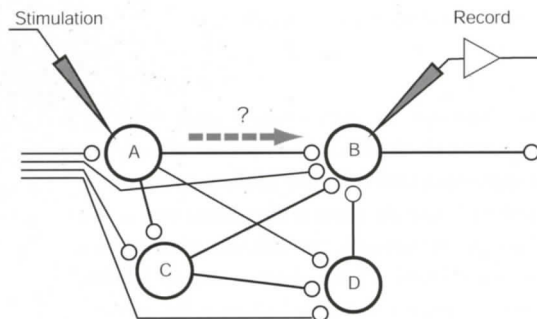


図2. ニューロン間信号伝達経路を同定することの困難さ

A-Dの4個のニューロンがあり、ニューロンAを刺激した時にニューロンBで応答が記録されたとしても、実際の信号が通り得る経路は複数考えられ、ニューロンAとニューロンBとが直接結合しているとは限らないことを示した模式図。大きな丸は細胞体、小さな丸はシナプス前終末、それらをつなぐ線は軸索を表している。

て来たのか断定することは困難である。この問題を解決するために、記録電極の位置を変えて複数の場所からデータを得ることにより、神経回路における信号の流れを同定しようという試みがなされてきた⁶⁾。しかしこの方法では、サンプリングできる細胞の数に限りがあるだけでなく、ニューロン活動が確率的であるため、信号伝播の途中に存在するニューロン全てに常に同じ活動が起こって

いるとは限らない。つまり、この方法では神経回路の振る舞いを同定することは困難である。そこで、多点電極を用いた神経信号の多点同時計測がなされるようになってきた⁷⁻⁹⁾。この多点電極を用いることにより、ニューロン集団から同時に活動電位や電場電位 (field potential) を計測することができる。しかしながら多点電極の電極数は限られており (市販のものでは多くても256電極)、電極間隔も通常100 μm 以上なので、ニューロンの細胞体の大きさが10-20 μm であることを考えると、ニューロン集団の少数の細胞 (あるいは領域) からしか情報を得ることができない。また、計測結果からどの位置のニューロンの活動が記録されているのか同定することは困難である。

これらの問題点を解決するためには、光学顕微鏡によるイメージング法(以下光学イメージング)が有利である¹⁰⁾。光学イメージングでは、解剖学的構造を可視化することができると共に、顕微鏡の視野に含まれる多くのニューロン集団の活動を同時に計測することが可能である。光学イメージングでは信号を検出するために主に蛍光指示薬をプローブとして用いるが、検出する信号により次の二つのイメージングがよく行われている: (1) 膜電位感受性色素を用いた、膜電位イメージング; (2) カルシウム (Ca^{2+}) 感受性蛍光指示薬 (単に Ca^{2+} 指示薬とも言う) を用いた、 Ca^{2+} イメージン

グ。

(1) の膜電位イメージングは、細胞の膜電位変化を直接蛍光量の変化として捉えるため、膜電位変化が発生している場所を同定した上で、膜電位の変化を計測することが可能である^{11,12)}。しかしながら、脳スライスなどの組織標本や *in vivo* では、膜電位感受性色素の蛍光変化量は最大でもおよそ 1% しかなく、信号がノイズに埋もれてしまいがちである。また膜電位感受性色素は細胞膜に埋め込まれるため、検出される信号は、ニューロンの表面積の大部分を占める樹状突起における膜電位変化が支配的になる。樹状突起は三次元的に密に重なり合っているため、培養神経細胞以外では単一細胞レベルの空間分解能を得ることができない¹³⁾。

(2) の Ca^{2+} イメージングでは、膜電位感受性色素を用いたイメージングと比べると、大きなシグ

ナルを得ることができるだけでなく（少なくとも数パーセント以上、計測法によっては最大 1,000% 程度の蛍光量の変化が得られる）、単一細胞以下の空間分解能があるため、脳スライス標本や *in vivo* 標本において、信号が検出された細胞の位置を同定した上で、その Ca^{2+} 動態を計測することができる¹⁰⁾。さらに、 Ca^{2+} 指示薬のアセトキシメチルエステル (acetoxymethyl ester: AM) 体を用いた、bulk-loading 法を併用することにより、多細胞から同時に Ca^{2+} 動態を計測することが可能である（図 3）^{10,13-16)}。

近年の遺伝子組換え技術の進歩により、特定の細胞種に特定の外来タンパク質が発現するような、遺伝子組換え動物を作成することが容易にできるようになってきている。この特定の外来タンパク質として、Green Fluorescent Protein (GFP) のような蛍光タンパク質を採用すれば、

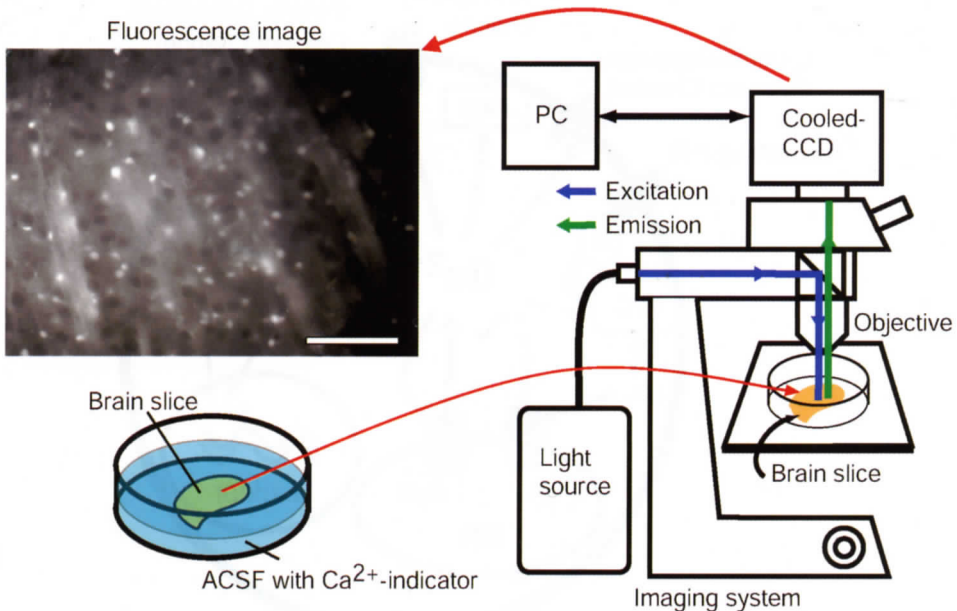


図 3. Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬の bulk-loading 法とイメージングシステム
 脳スライス (Brain slice) 標本などの組織切片を Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬 (Ca^{2+} -indicator) を含む人工脳脊髄液 (Artificial CerebroSpinal Fluid: ACSF) に浸しておくことにより、細胞内に Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬が導入（負荷）される（左下）。この Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬を負荷した脳スライス標本を、落射蛍光顕微鏡に冷却 CCD カメラ (cooled-CCD) を装備したイメージングシステムで観察することにより（右）、顕微鏡の視野中の多数の細胞を可視化することができ（左上）、それぞれの細胞から蛍光量の変化を記録することにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を計測することができる。スケールバー、100 μm 。

Ca^{2+} イメージングと同時に GFP などの蛍光を観察することにより、 Ca^{2+} 動態を計測しながら生きた標本で細胞種を同定することが可能である^{10,16)}。

本稿では、この Ca^{2+} イメージングによる細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の動態計測の例と意義を紹介する。なお、光学イメージングに関する一般的事項、 Ca^{2+} イメージングそのものの原理の解説は他誌に譲る^{16,17)}。

2. Ca^{2+} イメージングにより何が分かるのか？ 原理と実例

Ca^{2+} イメージングでは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を単一細胞レベルで可視化することが可能である。では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 計測によりどのような情報を得ることができるのだろうか？ 図4に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇機構と細胞内の Ca^{2+} が影響を及ぼす細胞内機構の

例を示す。細胞内 Ca^{2+} は、ニューロンのシナプス前末端において神経伝達物質の放出をトリガーするという重要な役割だけでなく¹⁸⁾、この図に示すように、イオンチャネルや酵素など様々なタンパク質の機能調節に関与している。例を挙げると、① Ca^{2+} 依存性カリウム (K^+) チャネルなどのイオンチャネルの機能調節、② リン酸化酵素など種々の酵素の機能調節、③ 遺伝子発現の調節、など様々な機能がある¹⁹⁾。つまり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の状態により細胞の状態が多様に変化する可能性がある。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する機構には主に次の三つのプロセスがある¹⁹⁾：(1) 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口による Ca^{2+} 流入；(2) Ca^{2+} 透過性受容体型チャネルの開口による Ca^{2+} 流入；(3) 小胞体 (Endoplasmic Reticulum: ER) などの細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出。以下、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する機構ごとに、 Ca^{2+} イメージングにより何が

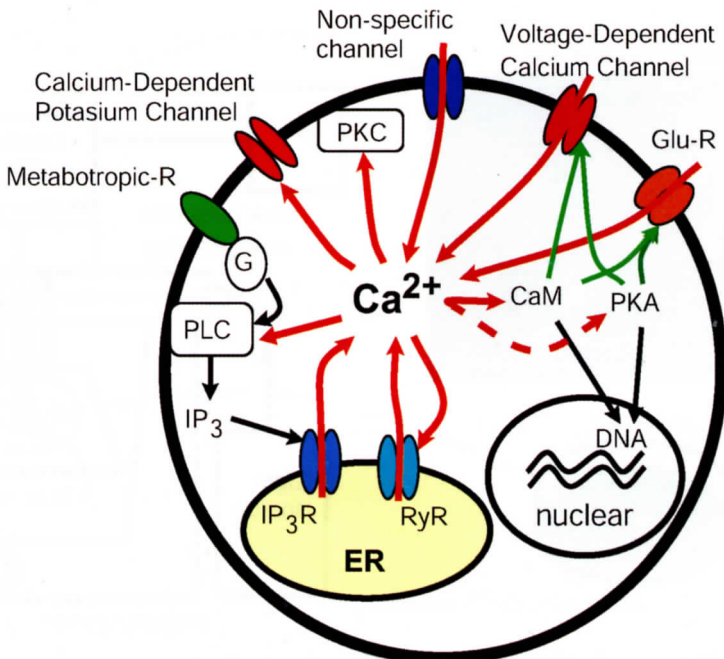


図4. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇機構と Ca^{2+} が作用する機能タンパク質の例
 Ca^{2+} が細胞内に流入する経路の例および、 Ca^{2+} が作用するイオンチャネルや酵素などの機能タンパク質の例を挙げた。(Glu-R: ionotropic glutamate receptor, Metabotropic-R: metabotropic receptor, CaM: calmodulin, PKA: protein kinase A, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C, G: G protein, IP_3 : inositol triphosphate, IP_3R : IP_3 receptor, RyR: ryanodine receptor, ER: endoplasmic reticulum)

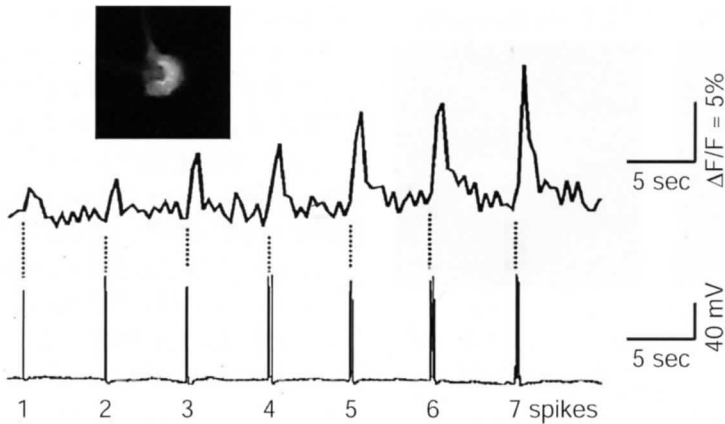


図5. 活動電位により上昇する $[Ca^{2+}]_i$

Ca^{2+} 指示薬が導入されているニューロンに対してパッチクランプ記録と Ca^{2+} イメージングを同時に行うと（上の蛍光写真），活動電位の発生に伴い（下段），活動電位の数に応じた蛍光強度の上昇が観測される（上段）。（上段） Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度変化比の時間経過（蛍光強度変化比とは，刺激前のベースラインの蛍光強度を F とし，ベースラインからの蛍光強度の変化量を ΔF とした時の， $\Delta F/F$ のことである）。（下段）細胞膜電位の時間経過。下の数字はその時に発生したスパイク数を表している。（文献 15 Fig. 1 (D) (Copyright (2005)) を Elsevier 社の許諾の下に転載）

分かるのかについて順次解説する。

(1) 電位依存性 Ca^{2+} チャンルの開口による Ca^{2+} 流入

膜電位の変化により電位依存性 Ca^{2+} チャンルが開口すると，細胞外から細胞内に Ca^{2+} が流入する。通常細胞外の Ca^{2+} 濃度は 2 mM 程度であり，静止時の $[Ca^{2+}]_i$ は 100 nM 以下であるので，チャンネルの開口により多量の Ca^{2+} が流入し， $[Ca^{2+}]_i$ が何倍にも変化する（シナプス前末端などでは活動電位発生により， $[Ca^{2+}]_i$ は数 μM - 100 μM にもなる^{18,20)}）。電位依存性 Ca^{2+} チャンルが開口するような膜電位変化は，ニューロンの場合活動電位によるものであることが多いため，この $[Ca^{2+}]_i$ 変化をプローブとして，ニューロン活動を計測することが可能である（図 5）^{13,15)}。しかも，前述のように Ca^{2+} イメージングでは，観察視野内の多くの細胞から同時に $[Ca^{2+}]_i$ 動態を計測可能であるため，神経回路を構成する複数のニューロンから，活動電位由来の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇を計測することにより，細胞間相互作用などを明らかにすることができる^{15,21,22)}（図 8 参照）。また脳スライス標本などに対して，*in vivo* における

入力を模擬した電気刺激を局所的に与えることにより，神経回路の活動を惹起することができ，刺激により惹起された神経回路内の信号伝播を可視化することも可能である（図 6）^{10,23)}。

(2) Ca^{2+} 透過性受容体型チャンネルの開口による Ca^{2+} 流入

神経伝達物質などを受容する受容体チャンネルの中には， Ca^{2+} 透過性のものがいくつか存在する。特に，グルタミン酸受容体のうち NMDA 型受容体は，ニューロンの樹状突起に存在し，海馬などではシナプス伝達の可塑性に重要な役割を担っているとして，研究が進められてきた²⁴⁾。この NMDA 型受容体の開口により，受容体が存在しているニューロンの樹状突起に局限した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こる²⁵⁾。この上昇した Ca^{2+} は種々の酵素の機能を調節し（図 4 参照），結果としてシナプス伝達効率に変化することで，記憶の基となる可塑性が引き起こされると考えられている。しかし，このような受容体型チャンネルを通した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は，受容体が存在する樹状突起上で局所的に観察されるため，AM 体を用いた多細胞イメージングで可視化するのは難しい。

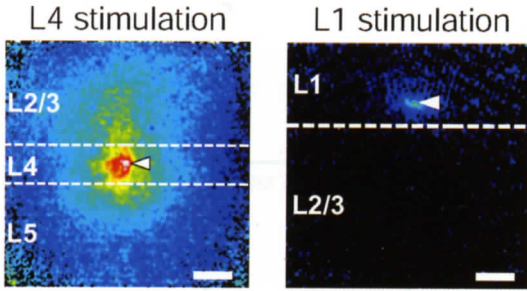


図6. 電気刺激により惹起された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇
マウス脳視覚野スライスに対して、先端径約 $10\ \mu\text{m}$ のガラス管微小電極を用いて $200\ \mu\text{s}$ の二相性電流刺激を、大脳皮質の4層(左: L4 stimulation)あるいは1層(右: L1 stimulation)に与えた際の $[Ca^{2+}]_i$ の最大値の分布(刺激電極は図中の白矢頭の場所に置いた)。蛍光強度変化比 $\Delta F/F$ を疑似カラー表示してあり、暖色系の色ほど $\Delta F/F$ が大きい(つまり $[Ca^{2+}]_i$ が大きく上昇している)。電気刺激により、刺激を受けた神経細胞が活動電位を発生し、その信号がシナプス伝達を介して伝播した結果が可視化できている。この結果から、4層に入力された信号は、1層に入力された信号と比べると、大脳皮質視覚野内を広範囲に伝播することが読み取れる。各図左に大脳皮質の層番号を示してある。スケールバー、 $100\ \mu\text{m}$ 。

ショウジョウバエの網膜で最初に見つかった TRP チャンネルが、細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇により開口し細胞外から細胞内に Ca^{2+} を流入させる Store-Operated Channel (SOC) であることが、近年明らかにされてきた^{26,27)}。この TRP チャンネルファミリーは、温度感受性があるものや、痛み受容と関係があるものなど様々な機能を持つサブタイプが報告されており、近年注目を集めている受容体型チャンネルであるが、詳細は他誌に譲る。

(3) ER などの細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出

(1) では、ニューロン活動のプロープとしての $[Ca^{2+}]_i$ 動態計測について述べたが、前述のように、細胞内 Ca^{2+} は様々な機能を有しており(図4)、細胞の状態を変化させる因子となり得る。(1)で示したような活動電位に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も、当然何らかの細胞内機構に関与していると考えられるが、ER などの細胞内 Ca^{2+} ストアから放出される Ca^{2+} は、それが代謝型受容体の活性化によ

り惹起されることから考えても、細胞内機構の調節に大きく関与していると考えられる^{19,28)}。アストロサイトをはじめとするグリア細胞などでは、ER からの Ca^{2+} 放出による持続時間の長い $[Ca^{2+}]_i$ 変動 ($[Ca^{2+}]_i$ リズム) が発生していることが以前から知られている。近年では、グリア細胞における $[Ca^{2+}]_i$ リズムとニューロン活動との間に相互作用があることが示唆されている^{29,30)}。しかし、後に挙げる例を除き、ニューロンにおける持続時間の長い自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムに関する報告は、ほとんど無い。

3. 大脳基底核線条体における長時間持続する自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズム

前述のように、ニューロンでは ER などの細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出に起因する、持続時間の長い自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムに関する報告はほとんどなされていなかった。小山内らは、ラット大脳基底核線条体スライス標本において、主に ER からの Ca^{2+} 放出に起因する、非常に持続時間の長い自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムを見出している(図7)^{31,32)}。本節では、この現象を紹介すると共に、 Ca^{2+} イメージングデータから細胞間相互作用を解析した例を紹介する。

線条体における自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムを解析したところ、持続時間は $17.5 \pm 28.7\ \text{s}$ であり(97 細胞 1,504 イベントの平均値 \pm 標準偏差)、最大持続時間は約 $300\ \text{s}$ であった(図7)^{31,32)}。これは前節(1)で述べた、活動電位由来の $[Ca^{2+}]_i$ 変動と比べるとはるかに遅い現象である。薬理学実験の結果から、この自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムは、予想通り、活動電位を阻害しても消失せず、細胞内 Ca^{2+} ストアに Ca^{2+} を補給するための Ca^{2+} ポンプ、あるいは ER から Ca^{2+} 放出を引き起こす inositol triphosphate (IP_3) 受容体を阻害することにより、その多くが消失したため、主に ER などの細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出により発生していることが分かった^{31,32)}。

一般に、 Ca^{2+} イメージングで得られる、自発活動の頻度は少なく、通常の相互相関係数を求める相関解析では、細胞間相関がはっきりしないこと

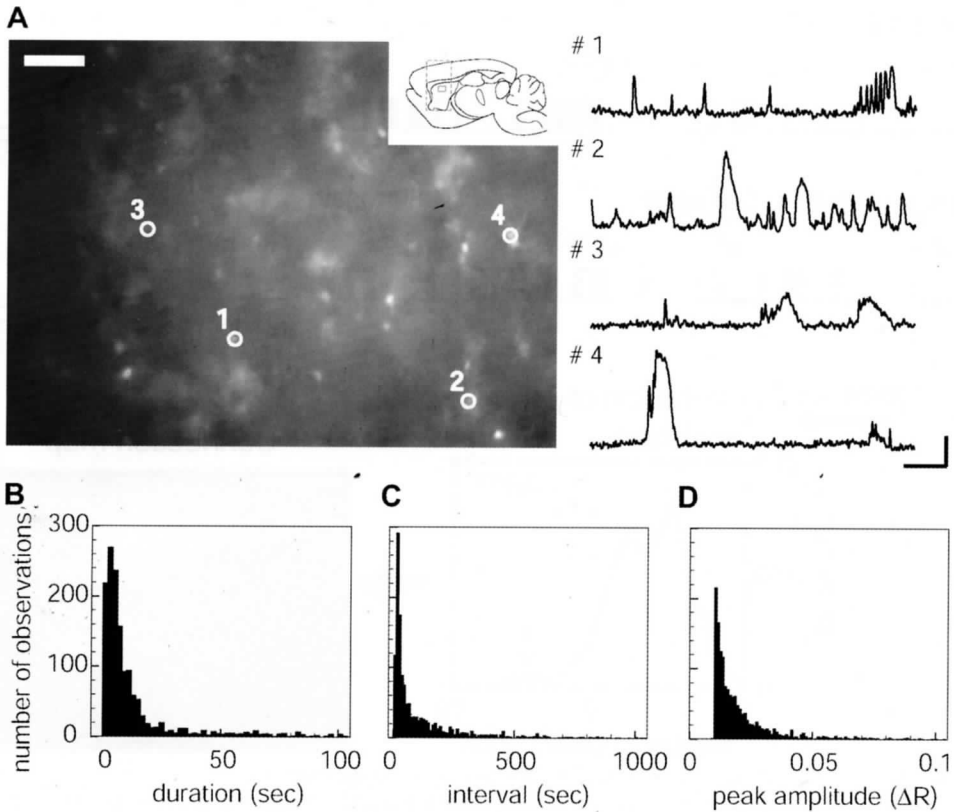
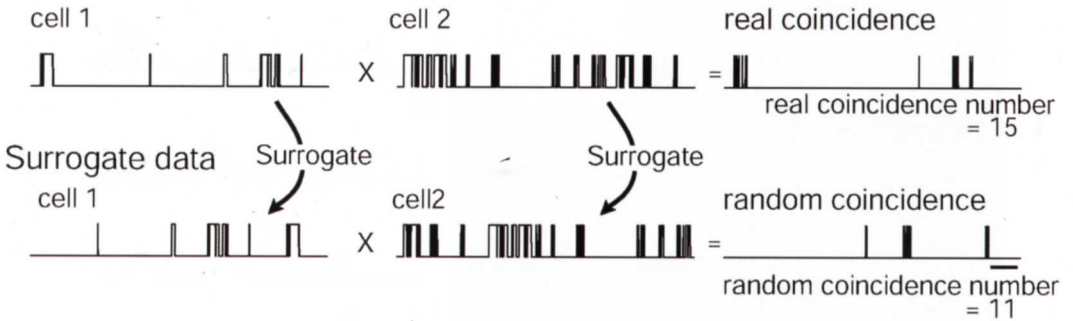


図7. ラット線条体スライス標本における自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズム
(上段 A) (左) Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬 Fura-PE3-AM を負荷したラット線条体スライスの蛍光写真。この写真で示した視野中の 37 の細胞から自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムが観測された。スケールバー, $50 \mu m$ 。蛍光写真の右上には、ラット脳の矢状断面の模式図上に、スライス標本の領域 (点線の四角) とイメージングした領域 (実線の四角) を示した。(右) 自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムの時間経過。それぞれの波形に付した番号は、左図に示した細胞の番号と対応している。(下段) 自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムの持続時間 (B, duration), 間隔 (C, interval), 振幅 (D, peak amplitude) の頻度分布。97 個の細胞から得られたデータをまとめてある。持続時間, 間隔, 振幅の中央値はそれぞれ, 8 s, 44 s, 0.0157 であった。(文献 31 Fig. 1 (Copyright (2006)) を Elsevier 社の許諾の下に転載)

が多い。そこで, $[Ca^{2+}]_i$ リズムの細胞間相関解析は, 以下の方法で行った (図 8)^{21,22,29,32}。 $[Ca^{2+}]_i$ の時系列データを二値化処理したものを細胞間で比較し, 自発 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の重なりがあった回数を数えた (real coincidence)。この二値化されたデータにランダムな時間区切りを設定し, その前後で時間関係を入れ替えた (surrogate data)。この surrogate data 間で一致した回数を数えた (random coincidence)。この surrogate data を 1,000 回作成するモンテカルロシミュレーション

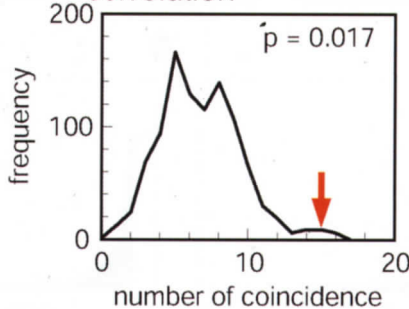
を行い, その一致回数の分布と real coincidence を比較し, それらの間に有意な差があった場合 (real coincidence が random coincidence の分布の面積の 95% 以上の点であった場合) に, この細胞間には有意な相互作用があると判断した (この相関解析法は, 前節 (1) で紹介した細胞間相関解析で用いられているものと同様である)。この方法で, 自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムの細胞間相関解析を行ったところ, 有意な細胞間相関が検出された細胞ペアが存在することが分かった (図 8)³²。この自発

Real data



repeat 1000 times

Distribution of pairwise correlation



Connection map

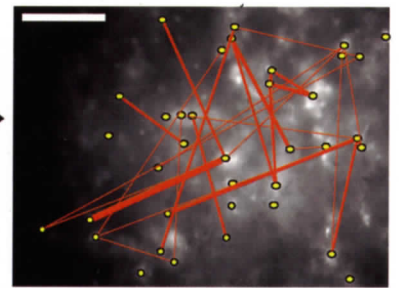


図 8. 線条体における自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムの相関解析の方法と細胞間相関マップ

(上段) 実験より得られた $[Ca^{2+}]_i$ の時系列データがある閾値で二値化したものを real data とする。ある細胞ペアの real data の積を取り、閾値以上 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しているタイミングが一致した回数を数える (real coincidence number)。同じ二値化データをランダムな時間区切りで前後関係を入れ替えたデータを作成し (surrogate data)、その積から、一致した回数を数える (random coincidence number)。(下段) この surrogate data の作成を 1,000 回繰り返すモンテカルロシミュレーションを行い、random coincidence number の頻度分布 (distribution of pairwise correlation) を作成する。Real coincidence number がこの頻度分布のどこに位置するかを調べ、危険率 5% 以下であれば、この細胞ペアには有意な相関があったとみなした。細胞間相関マップ (connection map) は、有意な相関があった細胞ペア同士を、危険率が低いほど線の太さを太くして、赤線で結んで作成した。

$[Ca^{2+}]_i$ リズムは活動電位由来ではないため、通常のシナプス伝達によるニューロン活動の細胞間相関とはその意味が異なるとは考えられるが、相関があったことは事実であり、何らかの細胞間情報伝達機構が関与していることが考えられる。

通常の動物を用いた実験では、この自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムがニューロンで起こっているのか、グリア細胞で起こっているのか明らかにすることは困難である。この問題を解決するために、グリア細胞の多くを占めるアストロサイトに、蛍光タンパク質である GFP を発現している遺伝子組換えマウ

ス (GFAP-GFP マウス) の線条体スライスを用いた実験を行った。その結果、GFP の蛍光が観測されない細胞 (おそらくニューロン) でも長時間持続する自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムが観測された (図 9)¹⁰⁾。自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムが観測された視野あたりの細胞数は、ニューロンでは 9.83 ± 7.76 個、アストロサイトでは 3.00 ± 3.91 個であった (数値は 18 個のスライス標本から得られた平均値 \pm 標準偏差を示している)。自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムが観測された細胞数はニューロンの方が有意に多かったが、免疫組織化学染色で確認されたニューロンとアストロサ

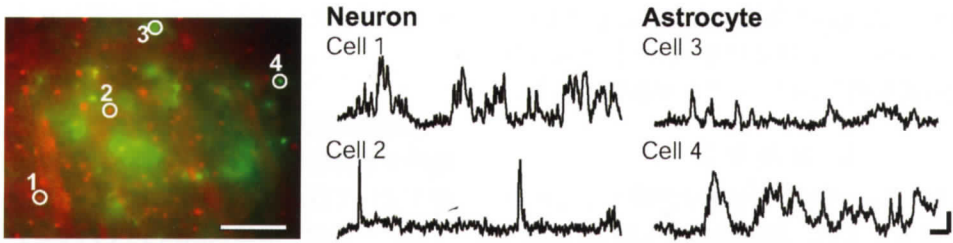


図9. GFAP-GFP マウス線条体ニューロン・グリアにおける自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズム
(左) GFAP-GFP マウス線条体スライスの蛍光写真。Ca²⁺ 感受性蛍光指示薬 Fura-PE3 の蛍光を赤で、GFP の蛍光を緑で示してある。スケールバー、100 μ m。(右) ニューロン (Neuron)、アストロサイト (Astrocyte) における自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズム。スケールバー、横軸 100 s、縦軸 Ca²⁺ 変化量。細胞の番号は (左) と対応している。

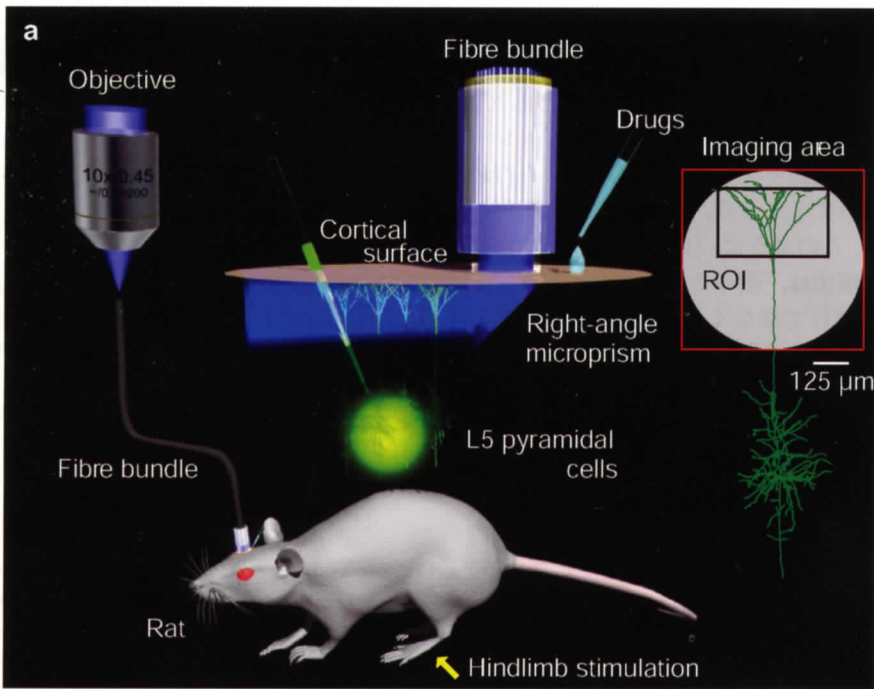


図10. *in vivo* ファイバースコープ Ca²⁺ イメージング法
大脳皮質5層の錐体細胞の先端樹状突起束 (apical tuft) から $[Ca^{2+}]_i$ を計測するための光ファイバー (fibre bundle) 顕微鏡を用いた実験系の模式図。(右) *in vitro* 実験から再構成した錐体細胞上に、イメージングエリア中の樹状突起束および関心領域 (ROI) が示されている。(文献 33 Figure 1a (Copyright (2009)) を Macmillan Publishers Ltd. の許諾の下に転載)

イトの比が約7:3であったことから、ニューロン・グリア間で $[Ca^{2+}]_i$ リズムが発生している細胞数の比率に違いは無いと思われる。

この線条体における自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムがどのような生理学的意義を持っているか現段階では不

明であるが、前述のように細胞内 Ca²⁺ は様々な機能を持っており、特にニューロンでは、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルなどイオンチャネルの活性を調節して、静止膜電位や、ニューロンの入出力特性を変化させている可能性が高い。今後、他の手法

も組み合わせ、更なる研究を重ねることにより、線条体ニューロンにおける自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムの生理学的意義を明らかにすることが必要である。

4. おわりに

本稿では、脳の情報処理機構を解明するための一つの手段としての、光学顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングの原理と例を紹介した。イメージング法の利点は何と言っても、細胞が可視化でき、その細胞から直接信号を検出することができる点である。この利点を生かして、近年では、二光子励起共焦点顕微鏡やファイバースコープ顕微鏡 (図 10) などの開発により、*in vivo* での Ca^{2+} イメージングが盛んに行われるようになってきている^{14,33)}。また非侵襲 Ca^{2+} イメージングとして、 Ca^{2+} の代わりに常磁性体である Mn^{2+} をトレーサーとした磁気共鳴イメージング (MRI) も行われるようになってきており、人体への臨床応用が期待される³⁴⁾。このように、 $[Ca^{2+}]_i$ 動態計測が盛んに行われる理由は、信号そのものを可視化できるという強みだけではなく、細胞内 Ca^{2+} がその状況に応じて様々な機能を持っているため、多くの細胞機能に関する計測が可能であるからではないかと思われる。また本稿では、脳における Ca^{2+} イメージングの例を紹介したが、あらゆる細胞で Ca^{2+} は機能しており、例えば、筋収縮、虚血による細胞死、膵臓からのインシュリン放出などの内分泌、受精、などでも重要な役割を果たしている。このように非常に応用範囲の広い Ca^{2+} イメージングは、今後、計測技術、実験技術の進歩により益々発展して行くと思われる。しかし、当然ながらこの Ca^{2+} イメージングも決して万能ではなく、研究者として、その限界を常に意識して研究を進めて行くことが肝要である。

また Ca^{2+} イメージングでは、多細胞から同時に連続的に変化する $[Ca^{2+}]_i$ がデータとして得られるため、その情報量は膨大である。ここで紹介した結果は、その膨大な情報量を持つデータから一部の情報しか抽出できていない。今後更なるデータ抽出・解析法の開発が必要になると思われるので、医学・生物学系の研究者だけではなく、数

学・物理学系の研究者の参画が望まれる。

謝 辞

本総説に記載したデータの一部は、科学研究費補助金基盤研究 (B) (課題番号: 19300105) の補助を受けて行われた研究によるものである。紹介したデータの一部は大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻生体システム・デバイス領域 (八木哲也教授) での実験により得られたものである。ここに感謝の意を表する。図 5¹⁵⁾、7³¹⁾ の使用を無償で許可して頂いた Elsevier および、図 10³³⁾ の使用を無償で許可して頂いた Macmillan Publishers Ltd. に感謝する。本総説執筆にあたって支持して頂いた、東北大学大学院医学系研究科医用画像工学分野森一生教授をはじめ、東北大学大学院医学系研究科保健学専攻放射線技術科学コースの全教員に感謝する。

文 献

- 1) Kandel, E.R., Schwarz, J.H., Jessell, T.M.: Essentials of neural science and behavior, McGraw-Hill, New York, 1995, p 21
- 2) Ling, G., Gerard, R.W.: The normal membrane potential of frog sartorius fibers, J. Cell. Comp. Physiol., **34**, 383-396, 1949
- 3) Nastuk, W.L., Hodgkin, A.L.: The electrical activity of single muscle fibers, J. Cell. Comp. Physiol., **35**, 39-73, 1950
- 4) Tomita, T.: The nature of action potentials in the lateral eye of the horseshoe crab as revealed by simultaneous intra- and extracellular recording, Jpn. J. Physiol., **6**, 327-340, 1956
- 5) Sakmann, B., Neher, E.: Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes, Annu. Rev. Physiol., **46**, 455-472, 1984
- 6) Mitzdorf, U.: Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena, Physiol. Rev., **65**, 37-100, 1985
- 7) Janders, M., Egert, U., Stelzle, M., Nisch, W.: Novel thin film titanium nitride micro-electrodes with excellent charge transfer capability for cell stimulation and sensing applica-

- tions, Bridging Disciplines for Biomedicine, Proceedings of the 18th Annual Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, **1**, 245-247, 1996
- 8) Jimbo, Y., Tateno, T., Robinson, H.P.C.: Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons, *Biophys. J.*, **76**, 670-678, 1999
- 9) Oka, H., Shimono, K., Ogawa, R., Sugihara, H., Taketani, M.: A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice, *J. Neurosci. Methods*, **93**, 61-67, 1999
- 10) Osanai, M., Okazaki, Y., Shiroma, S., Takeno, Y., Kaizo, H., Yamada, N., Tanaka, S., Yaguchi, Y., Yagi, T.: Visualization of brain activity from in vitro to in vivo, SCIS & ISIS 2008, 263-268, 2008
- 11) Grinvald, A., Shoham, D., Shmuel, A., Glaser, D.E., Vanzetta, I., Shtoyerman, E., Slovlin, H., Wijnbergen, C., Hildesheim, R., Sterkin, A., Arieli, A.: In vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics, Windhorst, U., Johansson, H. Eds., *Modern Techniques in Neuroscience Research*, Springer, Berlin, 1999, p 893-969
- 12) Grinvald, A., Lieke, E.E., Frostig, R.D., Hildesheim, R.: Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by realtime optical imaging of macaque monkey primary visual cortex, *J. Neurosci.*, **14**, 2545-2568, 1994
- 13) Smetters, D., Majewska, A., Yuste, R.: Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging, *Methods*, **18**, 215-221, 1999
- 14) Grewe, B.F., Helmchen, F.: Optical probing of neuronal ensemble activity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **19**, 520-529, 2009
- 15) Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., Yuste, R.: Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators, *Neurosci. Res.*, **52**, 132-138, 2005
- 16) 小山内実: バイオイメージング, 八木哲也編, 臨床医工学スキルアップ講座第二部先進医用生体計測・解析法, 大阪大学出版会, 大阪 (印刷中)
- 17) *Imaging Neurons: A Laboratory Manual*, Yuste, R., Lanni, F., Konnerth, A. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000
- 18) 小山内実, 成田和彦, 鈴木直哉, 木島博正, 久場健司: シナプス前終末のカルシウム動態と伝達物質放出, *細胞工学*, **16**, 40-47, 1997
- 19) Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D.: The versatility and universality of calcium signaling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11-21, 2000
- 20) Suzuki, S., Osanai, M., Murase, M., Suzuki, N., Ito, K., Shirasaki, T., Narita, K., Ohnuma, K., Kuba, K., Kijima, H.: Ca^{2+} dynamics at the frog motor nerve terminal, *Pflügers Arch.*, **440**, 351-365, 2000
- 21) Mao, B.-Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R.C., Yuste, R.: Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices, *Neuron*, **32**, 883-898, 2001
- 22) Ikegaya, Y., Aaron, G., Cossart, R., Aronov, D., Lampl, I., Ferster, D., Yuste, R.: Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity, *Science*, **304**, 559-564, 2004
- 23) Osanai, M., Shiroma, S., Takeno, Y., Uegaki, H., Tanaka, S., Yagi, T.: On the propagation of signals in visual cortex induced by electrical stimulation—Where to stimulate with a cortical implant?, *Proceedings of the International Symposium on Biological and Physiological Engineering/The 22nd SICE Symposium on Biological and Physiological Engineering*, 153-154, 2008
- 24) Nicoll, R.A., Malenka, R.C.: Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **868**, 515-525, 1999
- 25) Augustine, G.J., Santamaria, F., Tanaka, K.: Local calcium signaling in neurons, *Neuron*, **40**, 331-346, 2003
- 26) Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L.: trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry, *Cell*, **85**, 661-671, 1996
- 27) Minke, B.: TRP channels and Ca^{2+} signaling, *Cell Calcium*, **40**, 261-275, 2006
- 28) Verkhratsky, A.: Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplas-

- mic reticulum of neurons, *Physiol. Rev.*, **85**, 201-279, 2005
- 29) Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A., Soriano, E.: Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ, *J. Neurosci.*, **22**, 9430-9444, 2002
- 30) Zonta, M., Carmignoto, G.: Calcium oscillations encoding neuron-to-astrocyte communication, *J. Physiol. (Paris)*, **96**, 193-198, 2002
- 31) Osanai, M., Yamada, N., Yagi, T.: Long-lasting spontaneous calcium transients in the striatal cells, *Neurosci. Lett.*, **402**, 81-85, 2006
- 32) 小山内実, 矢口雄一, 山田尚宏, 大星文人, 八木哲也: 線条体における自発カルシウム濃度変化, 電気学会論文誌 C, **128**, 1050-1057, 2008
- 33) Murayama, M., Pérez-Garci, E., Nevian, T., Bock, T., Senn, W., Larkum, M.E.: Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons, *Nature*, **457**, 1137-1141, 2009
- 34) Tambalo, S., Daducci, A., Fiorini, S., Boschi, F., Mariani, M., Marinone, M., Sbarbati, A., Marzola, P.: Experimental protocol for activation-induced manganese-enhanced MRI (AIM-MRI) based on quantitative determination of Mn content in rat brain by fast T1 mapping, *Magn. Reson. Med.*, **62**, 1080-1084, 2009